云 南 植 物 研 究 2009, 31 (6): 493～498
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724 SP.J.1143.2009.09023

不同地理种源云南红豆杉的遗传多样性与紫杉醇含量相关性分析

于晓芹[1,2], 刘锡葵[1], 顾志建[1]
(1 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 应用 AFLP 和 HPLC 方法研究了云南红豆杉 (*Taxus wallichiana* var. *wallichiana*) 的遗传多样性与紫杉醇含量之间的关系。AFLP 指纹图谱显示 7 个居群谱带明显分为两种式样。PopGene1.31 和 Arlequin3.1 软件分析结果表明: 云南红豆杉居群内遗传比较稳定, 居群间遗传分化极其显著 (F_{st} = 0.67)。测定当年生小枝叶紫杉醇含量结果表明: 紫杉醇含量在居群间和居群内个体差异都较大。天然林中潞西居群的紫杉醇平均含量为 0.0185%; 腾冲和永德居群的紫杉醇含量比较低, 分别为 0.0049% 和 0.0087%; 禄丰栽培居群紫杉醇含量比较高, 平均为 0.0225%。在居群水平上, 遗传多样性和紫杉醇含量有一定程度的关联, 但在个体水平上明显无对应关系。

关键词: 云南红豆杉; 遗传多样性; 紫杉醇含量; AFLP; HPLC
中图分类号: Q 16 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700 (2009) 06-493-06

Analysis of Relationship Between Genetic Diversity and Taxol Content of *Taxus wallichiana* var. *wallichiana* in Different Provenance

YU Xiao-Qin[1,2], LIU Xi-Kui[1], GU Zhi-Jian[1**]
(1 *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China;
2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: We studied the relationship between genetic diversity and taxol content of *Taxus wallichiana* var. *wallichiana* using AFLP and HPLC. The results of AFLP fingerprinting indicated that two patterns were discovered among seven populations. Through PopGene 1.31 and Arlequin 3.1 software, stable genetics within population and significant differentiation among populations (F_{st} = 0.67) were revealed. However, taxol content was markedly different within and among populations when testing the one-year twigs. Among wild forests, the highest taxol content was found in Luxi population which average percentage was 0.0185%. While the taxol content level was low in Tengchong and Yongde populations, which were 0.0049% and 0.0087% respectively. The cultivated population in Lufeng showed the highest taxol content level which was 0.0225% comparing with that in the populations of wild forests. There were relations between genetic diversity and taxol content at the population level to some extent, while no corresponding relations were found at the individual level.

Key words: *Taxus wallichiana* var. *wallichian*; Genetic diversity; Taxol content; AFLP; HPLC

红豆杉属植物因含有紫杉醇、巴卡亭等抗癌化学成分而得到大量的研究开发。迄今, 植物化学

基金项目: 昆明自主择业集源生物有限公司经费支持, 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室、中国西南野生生物种质资源库和中国科学院昆明植物所知识创新工程项目基金 (540806321211)
通讯作者: Author for correspondence; E-mail: guzhijian@mail.kib.ac.cn
收稿日期: 2009-02-10, 2009-06-17 接受发表
作者简介: 于晓芹 (1983-) 女, 在读硕士研究生, 主要从事遗传多样性与次生代谢产物相关性的研究。

家们从该属植物中分离出了300多个紫杉烷类二萜化合物及许多生物碱类化合物（阮煜等，2006）。另外周其兴等（1998）对红豆杉属的遗传变异和亲缘关系进行研究；王艇等（2000）采用RAPD方法研究红豆杉科的遗传变异；吴丽圆和陈少瑜（2001a）用同工酶方法研究云南红豆杉的遗传变异；王达明等（2004）分析过藏东南云南红豆杉的紫杉醇含量，而有关遗传变异和紫杉醇含量相关性研究比较少。

云南红豆杉（*Taxus wallichiana* var. *wallichian*）也称须弥红豆杉，其紫杉醇含量较其它种高（王达明等，2004），而且该种分布集中，种群密度高（檀丽萍和陈振峰，2006），在优良种源的选育方面有优势。本研究从地理种源的角度出发采集了云南省7个云南红豆杉居群，结合AFLP、HPLC方法探讨遗传变异和紫杉醇含量之间的关系，为进一步揭示云南红豆杉的遗传变异幅度和规律、资源的保护利用和优良种源选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

材料于2007.8～11月采自云南维西、永德、潞西、云龙、南华、腾冲（部分为三年生枝条）、禄丰繁育基地（云南红豆杉栽培居群），共7个居群，137个个体（表1）。叶片用于分子实验，同株植物小枝叶做含量分析，凭证标本存放于昆明植物园。

1.2 AFLP分子标记实验

1.2.1 CTAB法（Doyle等，1987）提取DNA，稍作改良。

1.2.2 AFLP反应　AFLP反应所用的接头和引物序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，从30对引物中筛选出2对引物用于分析（表2）。

1.2.2.1 酶切反应　10 μl反应体系：2UMseⅠ（NEB），8U-EcorⅠ（NEB）；10×NEB Buffer 1 μl；10×BSA 1 μl；ddH_2O 4.4 μl. PCR仪中反应：37℃ 3.5 h；70℃ 30 min，-20℃保存。

1.2.2.2 连接反应　20 μl反应体系：4 μl酶切DNA；EA（10 pm $μl^{-1}$）2 μl，MA（50 pm ul^{-1}）2 μl；T_4连接酶（Fermentas）2U；T_4 Buffer 2 μl；dd H_2O 9.6 μl，16℃恒温水浴锅内反应13 h。

1.2.2.3 预扩增　25 μl反应体系：连接反应DNA 2 μl；E+A（5 pm $μl^{-1}$）1 μl，M+C（5 pm $μl^{-1}$）1 μl；Taq酶（Promega）0.2 μl；25 mmol L^{-1} Mg^{2}+1.5 μl；10 mmol L^{-1} dNTP（生工）0.5 μl；10×Buffer 2.5 μl；ddH_2O 16.3 μl. PCR仪内反应：94℃ 3 min；（94℃ 1 min，56℃ 1 min，72℃ 1 min）28个循环，72℃ 5 min，4℃保持。

1.2.2.4 选择性扩增　25 μl反应体系：稀释10倍的预扩产物2 μl；5 pm $μl^{-1}$的引物各1 μl；Taq酶（Takara）0.2 μl；25 mmol L^{-1} Mg^{2}+1.5 μl；10 mmol L^{-1} dNTP（生工）0.5 μl；10×Buffer 2.5 μl；dd H_2O 16.3 μl，冰盘上加样，离心，震荡混匀. PCR仪内反应：94℃ 3 min（94℃ 30 s，65℃ 30 s每个循环降低0.7℃，72℃ 60 s）×13；（94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 60 s）×30，72℃ 5 min，4℃ hold。

1.2.2.5 凝胶电泳　制备6%聚丙烯酰胺凝胶；预电泳U=1500 v，P=100 W，1×TBE 1.5 L，Tű 30 min；样品：甲酰胺Loading Buffer=1∶1，95℃变性7 min，进样8 μl；正式电泳U=1500 v，P=100 W，T=1 h 5 min。

表1　实验材料及来源

Table 1　Materials and source of resources

编号 Code	采集地点 Locality	个体数 Individuals	海拔 Altitude(m)	凭证标本 Voucher
A	维西	20	2965	YXQ07817001
B	禄丰	20	1900	YXQ070911002
C	潞西	20	2300	LS071011003
D	永德	18	2900	YD07006
E	云龙	19	2830	YL071107004
T	腾冲	20	2300	TC07007
H	南华	20	1947	NH071120005

1.2.2.6 银染显色　电泳结束，将胶板放在固定液中（200 ml C_2H_5OH+20 ml CH_3COOH，加水定容至2 L），震荡10 min；dH_2O清洗1 min；1.5% HNO_3振荡3 min；dH_2O清洗1 min；0.1% $AgNo_3$轻摇30 min；dH_2O漂洗2次，30 s次；3%预冷的$NaCO_3$+810 μl CH_3CHO；两者混匀之后显影；显影结束后加入25 ml CH_3COOH摇至没有气泡产生为止；dH_2O漂洗，保存。

表2　AFLP接头和引物序列

Table 2　AFLP adapters and primer sequences

接头			
EcorI接头	5′-CTCGTAGACTGCGTACC-3′ 3′-CATCTGACGCATGGTTAA-5′	MseI接头	5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′ 3′-TACTCAGGACTCAT-5′
预扩引物			
EcorI引物	5′-GTAGACTGCGTACCAATTCA-3′	MseI引物	5′-GACGATGAGTCCTGAGTAAC-3′
选择性扩增引物			
EcorI引物	E_1 5′-GACTGCGTACCA ATTCAGC-3′ E_2 5′-GACTGCGTACCAATTCACG-3′	MseI引物	M 5′-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3′

1.3　HPLC 实验

1.3.1　**仪器与试剂**　　Waters 高效液相色谱泵，Waters 2487 双波吸收检测器，威玛龙色谱工作站；紫杉醇对照品、进样甲醇为色谱纯，水为超纯水。其余操作中甲醇、乙醇、氯仿均为分析纯重蒸。

1.3.2　**色谱条件**　　色谱柱：SunFire C_{18}，4.6×150 mm 柱，填料粒度 5 μm，Waters 公司生产。流动相：甲醇∶水 = 75∶25；体积流速：1 ml min^{-1}；进样量：10 μl；检测波长：UV228 nm。在上述条件下，云南红豆杉中紫杉醇色谱峰与供试品中的其它组分色谱峰比较好地达到了基线分离。

1.3.3　**标准溶液配制**　　精确称取标准品 10 mg 溶于 50 ml 甲醇（色谱纯）中，再配成 0.05 mg ml^{-1}、0.02 mg ml^{-1}、0.005 mg ml^{-1} 四个浓度，定容后摇匀测定。进样后得标准曲线：$Y = 1.54\times10^{-8}X + 1.41\times10^{-5}$。

1.3.4　**样品溶液制备**　　将干燥的小枝叶粉碎，精确称 5.0 g 置于小口瓶中，加 100 ml 乙醇超声 2.5 h，40℃水浴回流，回收乙醇。滤渣用 4∶1 氯仿 - 甲醇萃取 3 次，合并溶液用 Al_2O_3 洗脱后，溶液 40℃水浴上回流，回收氯仿 - 甲醇。滤渣用 4∶1 氯仿 - 甲醇（分析重蒸）溶解后定容至 25 ml，定容后的溶液摇匀待测定。

1.4　数据处理

选择清晰的 AFLP 条带进行人工计数。依据每条带的分子量进行编码，同一引物组合扩增的分子量相同的条带视为同一位点。带的强度相差两倍时视为不同位点。有条带编码为 1，无条带编码为 0，形成数据矩阵。基于该数据矩阵，用 Popgene1.31 计算各参数，计算方法及参数意义见（Yeh 等，1999）。同时用 Arlequin3.1 进行 Amova 分析（Excoffier 等，1992），用所得的变异成分计算固定指数 Fst。HPLC 数据通过威玛龙色谱工作站自动输出，数据用 SPSS 15.0 分析。

2　结果

2.1　遗传多样性和遗传分化

不同居群的多态位点比例从 27.32% 到 41.53% 不等，其中维西多态位点比例最低为 27.32%，云龙多态比例最高为 41.53%。在物种水平上，多态位点比例、Nei′s 基因多样性指数、有效等位基因数目、Shannon 信息指数分别为 0.9290、0.2749、1.4527 和 0.4228。在居群水平上，多态位点比例、Nei′s 基因多样性指数、有效等位基因数目分别为 0.3271、0.1224、1.2122。

Amova 分析结果表明：云南红豆杉居群间的变异是居群内变异的 2 倍（各居群间变异占 66.70%，居群内变异占 33.30%），表明云南红豆杉居群变异成分主要发生在居群间；各居群间的遗传分化系数 F_{st} 为 0.67，表明居群间的遗传分化极显著。PopGene 所得遗传分化系数 G_{st} 为 0.5545（低于 F_{st} 值）同样表明居群间的遗传分化极显著。居群间基因交流指数 N_m 为 0.4018，表明居群间基因交流较少。在 7 个居群中，永德和云龙两个居群的遗传多样性参数较其它居群要高，说明这两个居群的个体遗传变异比较大。

2.2　紫杉醇含量

表 4 表明：云南红豆杉小枝叶中紫杉醇平均含量范围为 0.0049%～0.0225%，禄丰栽培居群的最高，平均含量为 0.0225%；其次是潞西居群，为 0.0185%；维西居群紫杉醇含量居中；而永德和腾冲居群（本居群的实验材料部分为三年生枝条）紫杉醇含量比较低，分别为 0.0087% 和 0.0049%。居群之间紫杉醇平均含量差异很大，平均最高含量是平均最低含量的 5.2 倍；而单株紫杉醇的含量从 0.0003%～0.0636% 不等，居群内和居群间个体差异达到极显著水平。标准差（SD）变动范围在 0.0041～0.01887 之间，禄丰居

表 3　7 个居群的遗传多样性与遗传结构参数

Table 3　Genetic diversity and genetic structure of 7 populations

Code	P (%)	H_e	I	N_a	N_e	N_m	H_t	H_s	G_{st}
H	29.51	0.1003	0.1497	1.2951	1.1729				
A	27.32	0.1009	0.1485	1.2732	1.1765				
B	29.51	0.1138	0.1676	1.2951	1.1963				
C	31.69	0.1253	0.1837	1.3169	1.2186				
D	40.98	0.1582	0.2322	1.4098	1.2775				
E	41.53	0.1505	0.2238	1.4153	1.2564				
T	28.42	0.1080	0.1593	1.2842	1.1875				
Mean	32.71	0.1224	0.1807	1.3271	1.2122				
Total	92.90	0.2749	0.4228	1.9290	1.4527	0.4018	0.2748	0.1224	0.5545

H_e = Nei′s gene diversity; I = Shannon′s Information index; N_a = Observed number of alleles; N_e = Effective number of alleles; N_m = gene flow; H_t = Variance components among populations; H_s = Variance components within population; F_{st} = gene differentiation index

表 4　Amova 遗传变异分析

Table 4　Analysis of genetic variance by Amova

	变异百分数 (Percentage)
居群内 Within population	0.3330
居群间 Among populations	0.6670
F_{st}	0.67

群个体之间紫杉醇含量差异较大，而永德居群则相对较稳定但整体含量比较低。7 个居群按紫杉醇平均含量排序依次为：禄丰 > 潞西 > 南华 > 云龙 > 维西 > 永德 > 腾冲。

2.3　相关性分析

腾冲和禄丰居群的遗传一致度最高，为 0.9430；腾冲和潞西居群的遗传一致度最低，为 0.6886；潞西和永德居群、维西和云龙居群的遗传一致度也相对较高，分为别 0.9128、0.9120 (表 5)。居群间显著的遗传差异主要由腾冲、禄丰和潞西居群引起。

以 0.01% 紫杉醇含量为准将 7 个居群分为两组 (表 4)：A 组高含量居群禄丰、潞西、南华、云龙为一组；B 组低含量居群维西、永德、腾冲为一组。两对引物 (AGC CTG、ACG CTG) 扩增出的所有条带中，A 组和 B 组单一组内无共同的特征条带，但是在 A 组中含量最高的禄丰居群和 B 组中含量最低的腾冲居群里却发现一致度非常高的谱带类型 (图 1)，其它居群的带型相差不大，推测禄丰栽培居群可能来源于腾冲。

SPSS 分析各居群的紫杉醇含量结果表明：在 $P = 0.05$ 的水平下，导致各居群含量差异达到显著水平的主要由腾冲、禄丰和潞西居群引起，这表明在居群水平上，遗传变异与紫杉醇含

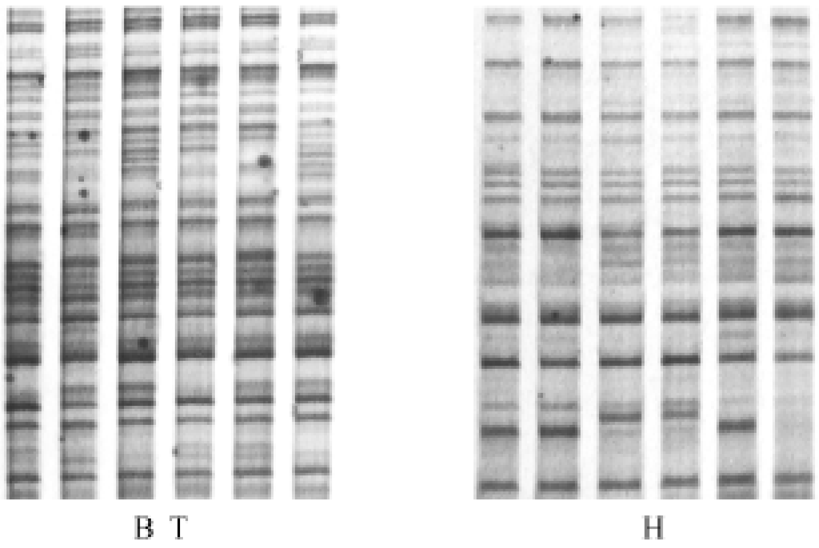

图 1　两种谱带模式：BT 为禄丰和腾冲居群，H 为南华居群

Fig. 1　Two banding patterns: BT represent Lufeng and Tengchong populations, H represent Nanhua population

表 5　各居群紫杉醇含量 SPSS 分析

Table 5　SPSS analysis of taxol content of the populations

编号 Code	个体 Number	平均值 Mean	最大值 Maximum	最小值 Minimum	标准差 Std. Deviation	标准误 Std. Error
H	20	0.0136	0.0313	0.0034	0.0098	0.0024
A	20	0.0098	0.0351	0.0035	0.0106	0.0038
B	20	0.0225	0.0636	0.0042	0.0188	0.0063
C	20	0.0185	0.0554	0.0010	0.0137	0.0031
D	18	0.0087	0.0159	0.0016	0.0041	0.0011
E	19	0.0120	0.0357	0.0015	0.0106	0.0033
T	20	0.0049	0.0151	0.0003	0.0053	0.0016
Total	137	0.0132	0.0636	0.0003	0.0120	0.0013

* 紫杉醇含量均为百分数。The taxol content is the percentage

表 6　7 个居群的遗传一致度和含量均数方差

Table 6　Genetic identity and mean content among 7 populations

居群编号	H	A	B	C	D	E	T
H	****	0.8269	0.7127	0.8826	0.8959	0.8345	0.7293
A	0.0039	****	0.7355	0.8342	0.8551	0.9120	0.7459
B	0.0089	0.0128*	****	0.6902	0.7077	0.7058	0.9430
C	0.0049	0.0087	0.0041	****	0.9128	0.8322	0.6886
D	0.0050	0.0011	0.0139*	0.0098*	****	0.8780	0.7213
E	0.0016	0.0022	0.0106*	0.0065	0.0036	****	0.7114
T	0.0088*	0.0049	0.0177*	0.0136*	0.0038	0.0071	****

遗传一致度 (右上角) 和含量均数方差 (左下角) * 表示在 $P = 0.05$ 水平下含量有显著差异

genetic identity (upper right corner), mean content (lower left corner). * taxol content indicates significant differences ($P = 0.05$)

量有某种程度的联系。而禄丰和腾冲居群在 AFLP 指纹图谱高度一致的情况下紫杉醇含量却出现最高水平和最低水平两个极限，这里可能暗示着通过人工栽培的云南红豆杉在生长条件优化的基础上，促进了紫杉醇含量的形成。

3　讨论

3.1　遗传多样性和居群分化程度

吴丽圆和陈少瑜（2001a）用同工酶研究过金沙江流域的 4 个云南红豆杉天然群体的遗传变异，物种水平上遗传多样性水平比较高，4 个小群体间遗传分化很小（$G_{st}=0.071$）。本研究用 AFLP 方法对云南省的西北部、西部、南部和中部的 7 个居群（包括来自禄丰的一个栽培居群）进行测定，物种水平上遗传多样性水平比较高，居群间遗传分化很显著（$G_{st}=0.5545$）。综合两者结果，我们认为云南红豆杉天然群体的遗传多样性水平比较高，在小群体范围内居群间遗传分化小，变异成分主要出现在居群内，大范围内居群间分化显著，变异成分主要出现在居群之间。在采集中发现部分地区的云南红豆杉遭到严重的人为破坏，有的居群云南红豆杉植株呈零星分布状态，种群密度较小。如此高水平的遗传多样性可能与云南红豆杉有比较丰富的遗传基础有关，人为破坏还没有影响到丰富的遗传基础。

云南红豆杉为风媒传粉植物，分雌雄同株和雌雄异株，本研究中发现居群之间基因交流水平低（$N_m=0.4018$）。这可能由于花粉的传播距离有限，居群间存在地理隔离，花期风力可能达不到所需的强度，影响了正常的传粉，最终导致了居群间的基因交流受限（Tauber，1967；Levin and Kerster，1974；Wheeler 等，1995；Xing，2000），使居群间产生一定程度的遗传分化。如此丰富的遗传多样性和遗传变异是植物适应外界环境变化的物质基础，也给选育优良的种质资源提供了丰富的遗传背景和研究材料。

3.2　紫杉醇含量

苏建荣等（2006）曾测定过藏东南云南红豆杉树皮、三年生小枝和当年生叶的紫杉醇，平均含量分别是 0.0058%、0.0075% 和 0.0049%；王达明等（2004）测定的云南红豆杉小枝叶中紫杉醇的平均含量为 0.0102%。本实验测定的当年生小枝叶中紫杉醇平均含量为 0.0132%，略高于上述结果，这可能与材料来源、取材时间不同（Cameron 等，2008）及分析误差有关。各居群间和居群内个体紫杉醇含量差异很大，其中腾冲、禄丰和潞西居群导致居群间紫杉醇含量差异达到显著水平。

紫杉醇是红豆杉属植物中重要的药用成分，与遗传因素、环境密切相关，多数研究者认为次生代谢物质的差异主要是受不同地理环境影响而产生。苏建荣等（2006）认为“温度因子”、“营养因子”和“光照因子”对云南红豆杉紫杉醇含量的影响很大。本研究中禄丰栽培居群的紫杉醇平均含量 0.0225%，无论和其它居群之间或是居群个体之间含量都差异较大。可能在人工栽培管理的过程中，一定程度地改变了群体生长的营养条件，同时对个体产生特定的刺激，从而引起植物群体和个体的次生代谢物含量上的差异。结果也表明人工栽培的云南红豆杉中紫杉醇的含量不比天然群体低，可能人工栽培过程中利于其生长因子促进了紫杉醇的形成，要确定具体的因素还要作进一步的跟踪分析。

3.3　遗传变异与紫杉醇含量的关系

吴丽圆等（2001b）采用同工酶技术研究过不同基因型个体与紫杉醇含量之间的关系，发现个体的紫杉醇含量与单一酶基因座并无直接关系，与多个酶基因座的综合效应有一定关联。本研究发现遗传变异大的居群在紫杉醇含量差异方面比较显著，遗传变异小的情况下紫杉醇含量差异性也比较小，如禄丰、腾冲和潞西三个居群在遗传变异上与其它大部分居群都有极显著的差异，而在紫杉醇含量方面也与其它居群有显著差异。在居群水平上，遗传变异某种程度上反映出紫杉醇含量的差异，但在个体水平上明显无直接关系。禄丰和腾冲两个居群的谱带式样一致并且比较特殊，但在紫杉醇含量方面却截然不同，这可能受环境的影响。同时在紫杉醇含量高的居群和低含量的居群内部没有发现独特的特征谱带，通过扩大引物筛选范围或许能找到相关的特征带，在植株生长的一定时期用作直观辨识。

致谢　胡运乾老师在分子标记实验中给予指导和帮助。

〔参 考 文 献〕

Cameron SI, Smith RF, 2008. Seasonal changes in the concentration of major taxanes in the biomass of wild canada yew (*Taxus canadensis* Marsh.) [J]. *Pharmaceutical Biology*, 46 (1-2): 35—40

Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11—15

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes, application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, (131): 479—491

Levin DA, Kerster HW, 1974. Gene flow in seed plants [J]. *Evolutionary Biology*, 7: 139—220

Ruan Y (**阮煜**), Huo F (**霍锋**), Zhang C (**张纯**) *et al.*, 2006. Research progress on chemical composition and pharmacology action of *Taxus* [J]. *Shanxi Forest Science and Technology* (**陕西林业科技**), (2): 1—5

Su JR (**苏建荣**), Zhang ZJ (**张志钧**), Chen ZY (**陈志勇**), 2006. Contents of anti-cancer active component in plant of *Taxus yunnanensis* from Southeast Tibet [J]. *Forest Research* (**林业科学研究**), 19 (1): 15—20

Tauber H, 1967. Differential pollen dispersion and filtration [A]. In: Cushing EJ, Wright HE Jr eds, Quaternary Paleoecology [M]. New Haven: Yale University Press, Connecticut, 131—141

Tan LP (**檀丽萍**), Chen ZF (**陈振峰**), 2006. *Taxus* resources in China [J]. *Journal of Northwest Forestry University* (**西北林学院学报**), 21 (6): 113—117

Wang T (**王艇**), Su YJ (**苏应娟**), Huang C (**黄超**) *et al.*, 2000. Phylogenetic relationship of Taxaceae based on random amplified polymorphic DNA [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (**西北植物学报**), 20 (2): 243—249

Wang DM (**王达明**), Zhou Y (**周云**), Li LF (**李莲芳**), 2004. Contents of anti-cancer active components in plant of *Taxus yunnanensis* [J]. *Journal of West China Forestry Science* (**西部林业科学**), 33 (3): 12—17

Wu LY (**吴丽圆**), Chen SY (**陈少瑜**), 2001a. Genetic diversity and population differentiation of *Taxus yunnanensis* in the Jinsha River Valley [J]. *Journal of Central South Forestry University* (**中南林学院学报**), 21 (3): 37—40

Wu LY (**吴丽圆**), Chen SY (**陈少瑜**), Xiang W (**项伟**), 2001b. Genetic variation of isoenzyme within natural population of *Taxus yunnanensis* in Yunnan of China [J]. *Hereditas* (Beijing) (**遗传**), 33 (3): 237—242

Wheeler NC, Jech KS, Masters SA *et al.*, 1995. Genetic variation and parameter estimates in *Taxus brevifolia* (Pacific yew) [J]. *Canadian Journal of Forest Research*, 25: 1913—1927

Xing SP, Chen ZK, Hu YX *et al.*, 2000. Ovule development, formation of pollination drop and pollination process in *Taxus chinensis* (Taxaceae) [J]. *Acta Botanica Sinica*, 42: 126—132

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, 1999. PopGene Version 1.3l, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis [Z]. University of Alberta and Centre for International Forestry Research

Zhou QX (**周其兴**), Ge S (**葛颂**), Gu ZJ (**顾志建**) *et al.*, 1998. Genetic variation and relationships within *Taxus* and between the genus and *Pseudotaxus* in China [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (**植物分类学报**), 36 (4): 323—332